

## SUMMARY.

1. Previous findings disproving the identity of liver aldolase (1-phosphofructaldolase) and crystalline muscle aldolase (1,6-diphosphofructaldolase) have been confirmed and extended. Highly purified muscle aldolase does not split fructose-1-phosphate even at concentrations of 0,5 mg enzyme/ml. (Optical method: oxydation of (DPN)H<sub>2</sub> in the presence of phosphoglycerol dehydrogenase). High purity of the enzyme is essential to prove its specificity for fructose diphosphate.

2. Liver aldolase is much more active than pure muscle aldolase in condensing aldehydes with the ketotriose part of fructose diphosphate. (Incubation of fructose diphosphate with the aldehyde in presence of the aldolase.) Condensing reactions attributed to „aldolases“ are mainly due to 1-phosphofructaldolase.

3. Pure muscle aldolase shows a weak but still detectable condensing activity, although, under the same experimental conditions, no splitting of fructose-1-phosphate by the enzyme may be detected. Two possible explanations of this fact are discussed: the equilibrium between the ketose-1-phosphates, favouring the condensation reaction, and a hypothetical group transferring action of the aldolases.

Zürich, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität.

---

## 204. Die Isolierung von Podophyllotoxin-glucosid aus dem indischen *Podophyllum emodi* Wall.

2. Mitteilung über mitosehemmende Naturstoffe<sup>1)</sup>

von A. Stoll, J. Renz und A. von Wartburg.

(21. VIII. 54.)

Die im Himalaja-Gebiet verbreitete Berberidacee *Podophyllum emodi* Wall. und die in Nordamerika heimische, nahe verwandte *P. peltatum* L. enthalten besonders in ihren Rhizomen reichliche Mengen Harz, das bei beiden Drogen eine ähnliche chemische Zusammensetzung aufweist, und das wegen seiner anthelmintischen, purgierenden und emetischen Eigenschaften schon seit langem sowohl in Indien, als auch in Nordamerika medizinische Verwendung fand. Neuerdings kommt den Inhaltsstoffen dieser Pflanzen vermehrtes Interesse zu, nachdem festgestellt wurde, dass die wasserunlöslichen Harzfraktionen, das Podophyllin oder Resina Podophylli, eine mitose-

---

<sup>1)</sup> Vorläufige 1. Mitteilung: Am. Soc. **76**, 3103 (1954).

hemmende und tumorzerstörende Wirkung auszuüben vermögen<sup>1)</sup>. Die chemische Untersuchung des Harzes, das in der amerikanischen Droge zu 4—5%, in der indischen Droge sogar bis zu 12% enthalten ist, führte schon vor längerer Zeit zur Isolierung des leicht kristallisierenden Podophyllotoxins<sup>2)</sup>, das später hinsichtlich der Beeinflussung von Zellteilungsvorgängen als der Hauptwirkstoff der Harzfraktion erkannt wurde. Nachdem durch die Untersuchungen von Späth<sup>3)</sup> und Borsche<sup>4)</sup> bereits wichtige Beiträge zur Aufklärung der Konstitution des Podophyllotoxins geliefert worden sind, ist in den letzten Jahren darüber hauptsächlich in Amerika durch J. L. Hartwell und seine Mitarbeiter<sup>1)</sup> eingehend gearbeitet worden. Diese Untersuchungen brachten Klarheit über die Feinheiten im chemischen Aufbau dieser Substanz, die einem als Lignan<sup>5)</sup> bezeichneten Verbindungstyp zugeordnet wird. Die Konstitution und Konfiguration des Podophyllotoxins ist in Formel I wiedergegeben<sup>6)</sup>.

Die gegenseitige räumliche Lage<sup>7)</sup> der Substituenten im gesättigten Ring B des Podophyllotoxins, in dem durch die Anwesenheit von vier asymmetrischen Kohlenstoffatomen zahlreiche Isomeriemöglichkeiten gegeben sind, ist in der Formel I angedeutet. Besonders auffallend an dieser Konfiguration ist die Lage der beiden am Lactonring beteiligten Substituenten an den C-Atomen 2 und 3, die in trans-Stellung zueinander stehen. Dadurch herrscht im Lactonring eine erhebliche Spannung, so dass er stark zu einer Neugruppierung neigt, in der die beiden Substituenten in cis-Stellung zu stehen kom-

<sup>1)</sup> Vgl. hierzu die eingehende Zusammenfassung über die Chemie und die biologischen Wirkungen von Podophyllin von M. G. Kelly & J. L. Hartwell, *J. Nat. Cancer Inst.* **14**, 967 (1954).

<sup>2)</sup> V. Podwyssotzki, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **13**, 29 (1881).

<sup>3)</sup> E. Späth, F. Wessely & J. Kornfeld, *B.* **65**, 1536 (1932); E. Späth, F. Wessely & E. Nadler, *B.* **65**, 1773 (1932); *B.* **66**, 125 (1933).

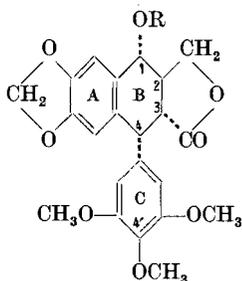
<sup>4)</sup> W. Borsche & J. Niemann, *A.* **494**, 126 (1932); *B.* **65**, 1633, 1790 (1932).

<sup>5)</sup> Die Bezeichnung Lignan wurde von R. D. Haworth vorgeschlagen für Verbindungen, denen das 2,3-Dibenzylbutan als Kohlenstoffskelett zugrunde liegt; vgl. *Ann. Reports on Progress of Chem.* **33**, 270 (1936).

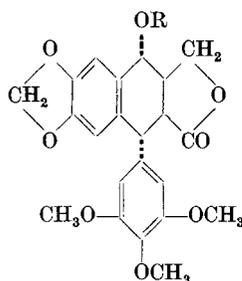
<sup>6)</sup> J. L. Hartwell & A. W. Schrecker, *Am. Soc.* **72**, 3320 (1950); **73**, 2909 (1951). Zu einer etwas andern Auffassung über die Konstitution des Podophyllotoxins gelangen J. Press & R. Brun, *Helv.* **37**, 190 (1954), auf Grund der Interpretation von Analysendaten und Vergleichen von UV.-Spektren. Diese Autoren schlagen eine um CH<sub>2</sub> reichere Formel mit einem einfach ungesättigten Lactonsechsring vor. Der Ausfall der Analysen ist bei diesen Substanzen weitgehend von der Art der Trocknung abhängig; unsere Analysen von Podophyllotoxin und seinen Derivaten, die wir durch Sauerstoffbestimmungen ergänzt haben, sprechen für die von Hartwell angenommene Formel C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>. Auch durch die Synthese eines DL-Stereoisomeren der Podophyllinsäure und von DL-β-Apocipopodophyllin von W. J. Gensler, C. M. Samour & S. Y. Wang, *Am. Soc.* **76**, 315 (1954), dürfte die Konstitution im Sinne der Hartwell'schen Formel entschieden sein. Vgl. hierzu noch die Diskussionen von A. W. Schrecker & J. L. Hartwell, *Helv.* **37**, 1541 (1954), und J. Press & R. Brun, *Helv.* **37**, 1543 (1954).

<sup>7)</sup> A. W. Schrecker & J. L. Hartwell, *Am. Soc.* **75**, 5916 (1953); **76**, 752 (1954).

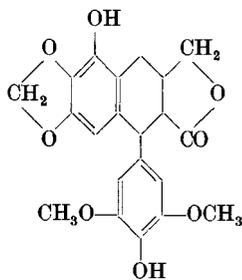
men (Formel III). Diese Umlagerung, die bereits unter der mildesten Alkalieinwirkung vor sich geht, führt zur Bildung von Picropodophyllin (III), das im Harz der Droge sehr wahrscheinlich ursprünglich nicht enthalten ist, sondern erst im Laufe der Aufarbeitung entstehen kann. Mit der Umlagerung von der labilen trans-Lactonverknüpfung des Naturstoffes in die stabile cis-Verknüpfung der Picro-Form geht die spezifische Wirksamkeit gegenüber Zellteilungsvorgängen verloren, obwohl sich die beiden raumisomeren Verbindungen nur in der Konfiguration am C 3 unterscheiden.



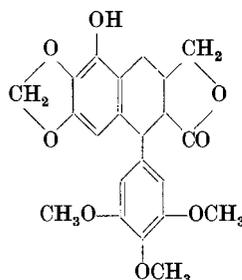
I R = H; Podophyllotoxin  
II R =  $\beta$ -Glucosido-Rest



III R = H; Picropodophyllin  
IV R =  $\beta$ -Glucosido-Rest



V  $\alpha$ -Peltatin



VI  $\beta$ -Peltatin

Im Podophyllotoxin und in seinem Umlagerungsprodukt Picropodophyllin ist das freie Hydroxyl am C 1 des gesättigten Ringes B als einzige, substituierbare und leicht abspaltbare<sup>1)</sup> Gruppe vorhanden. Es gelang vor kurzem, aus der indischen Droge ein Glucosid des Picropodophyllins zu isolieren<sup>2)</sup>, in welchem diese Hydroxylgruppe mit einem Mol Glucose verknüpft ist (Formel IV). Dieses Glucosid ist allerdings, wie die übrigen Komponenten des Harzes,

<sup>1)</sup> A. W. Schrecker, G. Y. Greenberg & J. L. Hartwell, Am. Soc. **74**, 5669 (1952); A. W. Schrecker & J. L. Hartwell, Am. Soc. **74**, 5672, 5676 (1952); A. W. Schrecker & J. L. Hartwell, Am. Soc. **76**, 752 (1954); A. W. Schrecker, G. Y. Greenberg & J. L. Hartwell, Am. Soc. **76**, 1182 (1954).

<sup>2)</sup> M. V. Nadkarni, P. B. Maury & J. L. Hartwell, Am. Soc. **74**, 280 (1952); M. V. Nadkarni, J. L. Hartwell, P. B. Maury & J. Leiter, Am. Soc. **75**, 1308 (1953).

kaum wasserlöslich und besitzt als Picro-Derivat auch keine biologische Wirksamkeit.

Aus der indischen Droge konnte neben dem Podophyllotoxin in kleinen Mengen noch ein methylärmeres Produkt, das 4'-Demethylpodophyllotoxin<sup>1)</sup> isoliert werden, das jenem in der Wirksamkeit sehr ähnlich ist, infolge der freien phenolischen Hydroxylgruppe jedoch durch eine positive Eisenchlorid-Reaktion ausgezeichnet ist. Das Harz der amerikanischen Pflanze *P. peltatum* enthält zwei weitere Wirkstoffe, nämlich das  $\alpha$ - und das  $\beta$ -Peltatin<sup>2)</sup>. Beiden ist der labile Lactonring eigen; sie unterscheiden sich vom Podophyllotoxin auch nicht in ihrem Grundgerüst, sondern lediglich durch eine etwas andersartige Substitution desselben<sup>3)</sup>. Charakteristisch für die Peltatine ist das Fehlen der freien alkoholischen Hydroxylgruppe im Ring B; dagegen sind sie durch eine freie phenolische OH-Gruppe im aromatischen Ring A ausgezeichnet. Das  $\alpha$ -Peltatin (V) steht zum  $\beta$ -Peltatin (VI) im gleichen Verhältnis wie 4'-Demethylpodophyllotoxin zum Podophyllotoxin:  $\alpha$ -Peltatin ist demnach das 4'-Demethyl- $\beta$ -peltatin. Die beiden Peltatine verhalten sich biologisch ähnlich wie das Podophyllotoxin.

Für die Prüfung der biologischen Wirksamkeit bereitet die Unlöslichkeit der bisher erwähnten Verbindungen in Wasser meistens Schwierigkeiten. Es sind deshalb auch schon Versuche unternommen worden, wasserlösliche Derivate des Podophyllotoxins synthetisch herzustellen<sup>4)</sup>. Ein anderer Weg bestand darin, dass man natürliche Droge auf wasserlösliche, wirksame Inhaltsstoffe untersuchte. In diesem Sinne haben wir die Rhizome der indischen Pflanze auf das Vorkommen eines Glykosids des Podophyllotoxins geprüft, denn wir hofften damit zu einem Naturprodukt mit geringerer Toxizität zu gelangen.

Da für das Podophyllotoxin keine charakteristischen Farbreaktionen bekannt sind, so mussten wir zur Beurteilung der im Laufe der Aufarbeitung anfallenden Fraktionen zu präparativen Methoden greifen. Es gelang uns, aus gewissen rohen wasserlöslichen Fraktionen, die kein freies Podophyllotoxin mehr enthielten, nach Einwirkung von Emulsin erneut Podophyllotoxin zu isolieren. Diese Befunde machten es sehr wahrscheinlich, dass in den entsprechenden Fraktionen ein durch  $\beta$ -Glucosidase spaltbares Glucosid vorhanden sein müsse. Mit Hilfe dieses Testes war es möglich, einen alkoholischen Auszug der indischen Droge, die durch vorherige Chloroformextraktion

<sup>1)</sup> Vgl. Anmerkung 2, S. 1749.

<sup>2)</sup> *J. L. Hartwell*, *Am. Soc.* **69**, 2918 (1947); *J. L. Hartwell & W. E. Detty*, *Am. Soc.* **70**, 2833 (1948); **72**, 246 (1950).

<sup>3)</sup> *J. L. Hartwell*, *A. W. Schrecker & G. Y. Greenberg*, *Am. Soc.* **74**, 6285 (1952); *A. W. Schrecker & J. L. Hartwell*, *Am. Soc.* **75**, 5924 (1953).

<sup>4)</sup> *A. W. Schrecker, G. Y. Greenberg & J. L. Hartwell*, *Am. Soc.* **76**, 1184 (1954).

von den Harzen weitgehend befreit worden war, so weit zu reinigen, dass schliesslich Präparate resultierten, die das gesuchte Glucosid zu etwa 40–70% angereichert enthielten. Trotz vielen Versuchen konnte aus diesen Präparaten kein Glucosid in kristallisierter Form abgetrennt werden. Wir versuchten deshalb, durch Acetylieren dieser Fraktionen und Chromatographie der Acetate zu einer kristallisierten Verbindung zu gelangen. Wurde z. B. ein solches acetyliertes Präparat in Benzollösung an Aluminiumoxyd chromatographiert, so konnte aus mehreren Fraktionen nach Anreiben mit Methanol eine kristallisierte, in der Kälte in Wasser schwerlösliche Verbindung erhalten werden. Sie schmolz nach dem Umkristallisieren aus Methanol bei 135° und hatte in Methanollösung einen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = -90^\circ$ . Die Analysenwerte stimmten gut auf ein Tetracetyl-podophyllotoxin-glucosid ( $C_{36}H_{40}O_{17}$ ).

Beim Versuch, aus diesem kristallisierten Derivat die Acetylgruppen wieder abzuspalten, entstand eine gut kristallisierende und schwerlösliche Verbindung, die indessen in ihren Eigenschaften nicht mit Podophyllotoxin-glucosid, sondern mit dem schon bekannten Picropodophyllin-glucosid völlige Übereinstimmung zeigte. Nach erneuter Acetylierung dieses Desacetylproduktes wurde eine Verbindung erhalten, die von dem ursprünglichen Tetracetyl-Derivat deutlich verschieden war, und deren Eigenschaften für das Vorliegen von Tetracetyl-picropodophyllin-glucosid<sup>1)</sup> sprachen.

Auch die schonendste Desacetylierung des Tetracetats aus dem Naturprodukt, die wir z. B. bei Gegenwart von Spuren Bariummethylat in Methanollösung bei 0° oder mit Kaliumhydrogencarbonat in wässrigem Methanol bei 20°<sup>2)</sup> vornahmen, führte also bereits zu einer Umlagerung in die biologisch inaktive Picroform. Damit war uns auch der Weg zur Isolierung des in *P. emodi* nun sicher nachgewiesenen Podophyllotoxin-glucosids über sein kristallisiertes Acetylderivat versperrt, und wir waren darauf angewiesen, das freie Glucosid aus den angereicherten Fraktionen als solches zu isolieren. Ein zum Ziele führendes Anreicherungsverfahren bestand in der Verteilung zwischen nicht mischbaren Lösungsmitteln in einer Säulenordnung, die sich auch zur Isolierung von Herzglykosiden als geeignet erwiesen hatte. So konnte z. B. durch Verteilen einer etwa zur Hälfte aus dem neuen Glucosid bestehenden Fraktion mit Essigester in einer Säule aus mit Wasser gesättigtem „Diatomitstein“ als Trägermaterial<sup>3)</sup> eine weitgehende Reinigung des Glucosids erzielt werden; allerdings gelang es auch jetzt nicht, ein kristalli-

<sup>1)</sup> *M. V. Nadkarni, J. L. Hartwell, P. B. Maury & J. Leiter, Am. Soc.* **75**, 1308 (1953).

<sup>2)</sup> Diese Methode wurde zur Spaltung von Herzglykosidacetaten empfohlen; vgl. *H. Rosenmund & T. Reichstein, Pharm. acta Helv.* **17**, 176 (1942).

<sup>3)</sup> Nähere Angaben über diese Methode finden sich in der Arbeit *A. Stoll & W. Kreis, Helv.* **34**, 1431 (1951).

siertes Präparat zu erhalten. Die schwer abzutrennenden Begleitstoffe zeichnen sich zum Teil durch eine positive Eisenchloridreaktion aus<sup>1)</sup>.

Nach erneuter Verteilung der Hauptfraktion in einer Säule unter etwas andern Bedingungen<sup>2)</sup> wurde ein immer noch amorphes Präparat erhalten, das nach dem Umfällen aus Aceton-Äther ein lockeres, fast weisses Pulver darstellte. Auf Grund von Analysen und der Ergebnisse von Abbaureaktionen konnte dieses Präparat als reines Podophyllotoxin-glucosid (II) angesehen werden. Die amorphe Verbindung schmilzt ziemlich scharf bei 152–154<sup>o</sup><sup>3)</sup> und besitzt in wässriger Lösung einen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = -65^{\circ}$ , in Methanol von  $[\alpha]_D^{20} = -75^{\circ}$  und in Pyridin von  $[\alpha]_D^{20} = -117^{\circ}$ . Die Verbindung hält hartnäckig Feuchtigkeit zurück und bereitet bei der Analyse ähnliche Schwierigkeiten, wie sie von Podophyllotoxin bekannt sind.

Die Analyse eines scharf getrockneten Präparates passt auf die Formel  $C_{28}H_{32}O_{13}$  mit  $\frac{1}{2}$  Mol Wasser. Die letzten Spuren Wasser können erst unter Bedingungen entfernt werden, unter denen bereits eine merkliche Zersetzung des Glucosids beginnt.

Das UV.-Spektrum des amorphen Glucosidpräparates stimmt mit demjenigen des Podophyllotoxins<sup>4)</sup> praktisch überein. Es ist gekennzeichnet durch ein Maximum bei 291 m $\mu$  ( $\log \epsilon = 3,62$ ) und ein Minimum bei 260 m $\mu$  (Fig. 1).

Gegenüber allen bisher isolierten Wirkstoffen aus der Podophyllumdroge ist das neue Glucosid durch eine relativ gute Löslichkeit in Wasser ausgezeichnet, so dass z. B. 2-proz. Lösungen in Wasser oder 5-proz. Lösungen in 10-proz. Alkohol bei Zimmertemperatur beständig sind. Spielend löslich ist das Glucosid in vielen organischen Lösungsmitteln, wie Methanol und Äthanol, Essigester und Aceton, auch in Eisessig und Pyridin. Bemerkenswert ist der grosse Unterschied in der Wasserlöslichkeit von Podophyllotoxin-glucosid und Picropodophyllin-glucosid: Bei Gegenwart von Spuren Alkali scheidet sich aus

---

<sup>1)</sup> Eine dieser Verbindungen, die in sehr geringer Menge auftritt, gibt mit Eisenchlorid in wässriger Lösung eine grüne Färbung; eine andere, die in etwas grössern Mengen vorhanden ist, zeigt mit diesem Reagens in wässriger Lösung eine braunrote, in rein alkoholischer Lösung eine grüne Färbung. Über diese Verbindung werden wir später ausführlich berichten. Eine vorläufige Mitteilung ist inzwischen in Am. Soc. **76**, im Druck erschienen 5. 10. 1954.

<sup>2)</sup> Zur Trennung dieses Glucosids von Begleitstoffen durch Verteilen zwischen Essigester und Wasser ist auch eine *Craig*-Apparatur geeignet. Die Verteilungszahl zwischen diesen beiden Lösungsmitteln beträgt 63.

<sup>3)</sup> Nach vierstündigem Trocknen im Hochvakuum bei 80°. In unserer ersten Mitteilung, Am. Soc. **76**, 3103 (1954), haben wir einen etwas tieferen Smp. angegeben (149–152°).

<sup>4)</sup> *J. L. Hartwell & W. E. Detty*, Am. Soc. **72**, 251 (1950).

einer wässrigen Lösung von Podophyllotoxin-glucosid das schwerlösliche Isomerisierungsprodukt fast quantitativ in Nadeln ab.

Sowohl das Podophyllotoxin-glucosid als auch das Aglucon geben in reinem Zustand in eisenchloridhaltigem Eisessig nach Zugabe von etwas konz. Schwefelsäure eine weinrote Färbung. Unterschichtet man die Eisessig-Lösung vorsichtig mit konz. Schwefelsäure, so entsteht an der Phasengrenze ein weinroter Ring (*Keller-Kiliani-Reaktion*). Podophyllotoxin-glucosid gibt keine Eisenchloridreaktion und kann so von manchen andern Begleitstoffen unterschieden werden<sup>1)</sup>.

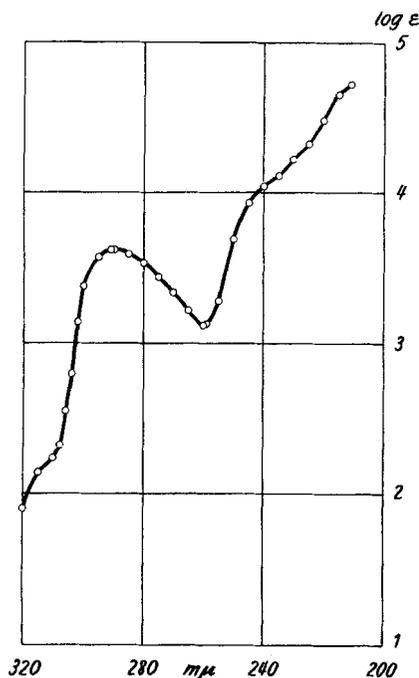


Fig. 1.

UV.-Spektrum von Podophyllotoxin-glucosid in abs. Alkohol.

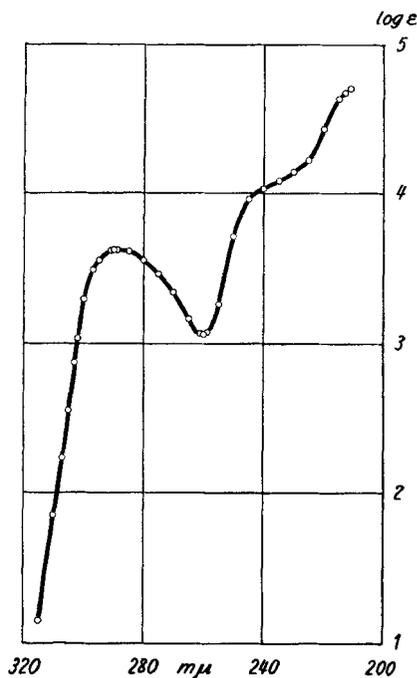


Fig. 2.

UV.-Spektrum von Picropodophyllin-glucosid in abs. Alkohol.

Bei der Acetylierung des Glucosids mit Essigsäureanhydrid-Pyridin entsteht die bereits oben erwähnte kristallisierte Tetracetyl-Verbindung,  $C_{36}H_{40}O_{17}$ , in fast quantitativer Ausbeute. Aus der fünf-fachen Menge Methanol scheidet sich das Tetracetat in Nadeln ab; es schmilzt bei  $134-135^{\circ}$  und besitzt die optische Drehung  $[\alpha]_D^{20} = -91^{\circ}$  (in Chloroform). Sein UV.-Spektrum ist identisch mit dem des freien Glucosids (Fig. 1).

<sup>1)</sup> Vgl. Anmerkung 1, S. 1752.

Da bei der Beurteilung der Einheitlichkeit des amorphen Glucosidpräparates trotz guter Analysenresultate eine gewisse Unsicherheit nicht von der Hand zu weisen war, so haben wir noch zwei weitere Reaktionen, nämlich die Umlagerung in die Picroform und die enzymatische Spaltung als Kriterium für Reinheit und Einheitlichkeit des neuen Glucosids herangezogen.

Es gelang aus unserm Podophyllotoxin-glucosid-Präparat durch Einwirkung von Ammoniak in Methanollösung bei Zimmertemperatur mit ca. 98% Ausbeute die entsprechende Picro-Verbindung in kristallisierter Form zu fassen. Das Isomere ist in fast allen Lösungsmitteln schwer löslich; zur Umkristallisation wird z. B. die 300- bis 400-fache Menge von siedendem 75-proz. Methanol benötigt. Das daraus sich abscheidende Picropodophyllin- $\beta$ -D-glucosid ist charakterisiert durch einen Doppelschmelzpunkt bei 235–236<sup>0</sup>/252–254<sup>0</sup><sup>1)</sup> und besonders durch einen nur schwach negativen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = -10,5^0$  (in Pyridin). Für die Analyse spielt die Art der Trocknung auch beim Picroglucosid eine wichtige Rolle; nach vierstündigem Trocknen im Hochvakuum bei 100<sup>0</sup> erhält man Werte, die gut auf eine Formel  $C_{28}H_{32}O_{13}$ ,  $\frac{1}{2} H_2O$  passen.

Zur weiteren Charakterisierung des Umlagerungsproduktes haben wir noch das Tetracycl-picropodophyllin-glucosid,  $C_{36}H_{40}O_{17}$ , dargestellt. Das aus Chloroform-Methanol-Gemischen in feinen Nadeln kristallisierende Derivat<sup>1)</sup> schmilzt scharf bei 278–279<sup>0</sup> und besitzt in Pyridinlösung den Drehwert  $[\alpha]_D^{20} = -3,2^0$ .

Das Podophyllotoxin-glucosid wird in wässriger Lösung bei pH 5 von  $\beta$ -Glucosidase aus bitteren Mandeln relativ rasch zerlegt. Schon nach knapp 30 Min. beginnt sich aus der mit Enzym versetzten wässrigen Glucosid-Lösung das kaum lösliche Podophyllotoxin in feinen Nadeln abzuscheiden; nach 24 Stunden ist praktisch die gesamte Menge des eingesetzten Glucosids in Aglykon und Zucker gespalten. Das Podophyllotoxin lässt sich durch Umkristallisieren aus Alkohol oder Benzol-Petroläther leicht reinigen und schmilzt in dieser kristalllösungsmittelhaltigen Form unter Aufschäumen bei 114–117<sup>0</sup>. Zur Entfernung des Kristalllösungsmittels muss die Substanz längere Zeit im Hochvakuum auf 100<sup>0</sup> erhitzt werden. Dabei verwittern die Kristalle und blähen sich allmählich zu einer amorphen Masse auf. Für diese getrocknete, amorphe und hygroskopische Form des Podophyllotoxins fanden wir einen um 130–140<sup>0</sup> liegenden, nicht charakteristischen Schmelzpunkt<sup>2)</sup>, und

<sup>1)</sup> *M. V. Nadkarni, J. L. Hartwell, P. B. Maury & J. Leiter, Am. Soc. 75, 1308 (1953).* Der Smp. des Picroglucosids wird bei 237–238,2<sup>0</sup> angegeben, derjenige des Acetylderivats bei 269–270,2<sup>0</sup>.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu auch die Angaben von *E. Späth, F. Wessely & L. Kornfeld, B. 65, 1536 (1932)*, und *J. L. Hartwell & A. W. Schrecker, Am. Soc. 73, 2909 (1951)*. Wir konnten die in der Literatur zum Teil erwähnten höhern Smp. (bis 184<sup>0</sup>) für die hochvakuumtrockene Substanz nicht erreichen.

$[\alpha]_D^{20} = -131,7^\circ$  (in Chloroform). Beim Umkristallisieren erhält man stets wieder die schön kristallisierte, tiefschmelzende Form. Die Analyse des kristallwasserfreien Podophyllotoxins passt gut auf die Formel  $C_{22}H_{22}O_8$ .

Das UV.-Spektrum des Podophyllotoxins ist nicht zu unterscheiden von demjenigen des Glucosids (Fig. 1): Sein Maximum liegt bei  $291\text{ m}\mu$ ,  $\log \epsilon = 3,64$ .

Das Podophyllotoxin bildet eine aus abs. Alkohol in Prismen kristallisierende Monoacetyl-Verbindung, die bei  $210\text{--}211^\circ$  schmilzt und auf Grund der Analyse die Formel  $C_{24}H_{24}O_9$  besitzt.

Der bei der enzymatischen Spaltung des Podophyllotoxin-glucosids frei werdende Zucker konnte über das  $\alpha$ -Methyl-D-glucosid (1,5) als D-Glucose identifiziert werden. Die leichte Spaltbarkeit des Glucosids mit  $\beta$ -Glucosidase spricht für das Vorliegen eines  $\beta$ -Glucopyranosids.

Die Abbauversuche und die Identifizierung der Spaltprodukte bestätigen die Einheitlichkeit unseres amorphen Glucosidpräparates und charakterisieren es als 1-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosido)-podophyllotoxin (II).

Als für biologische Versuche wichtigste Eigenschaften des neuen Glucosids erscheinen uns seine Löslichkeit in Wasser und seine leichte Spaltbarkeit mit  $\beta$ -Glucosidase. Biologische Vorversuche, die in unserem pharmakologischen Laboratorium (Prof. Dr. E. Rothlin) gemacht wurden, deuten darauf hin, dass auch das Glucosid die mitosehemmende Wirkung besitzt, dass aber bei ihm die Toxizität gegenüber dem Podophyllotoxin bedeutend herabgesetzt und damit die Verträglichkeit erhöht ist.

### Experimenteller Teil<sup>1)</sup>.

1. Isolierung und Eigenschaften von Podophyllotoxin- $\beta$ -D-glucosid. 1 kg der getrockneten Rhizome von *Podophyllum emodi* Wall. wurde fein gemahlen und dann dreimal bei Zimmertemperatur mit der 5fachen Menge Chloroform während kurzer Zeit ausgerührt. Die klaren gelben Chloroformextrakte hinterliessen nach dem Eindampfen ca. 90 g Harz, in welchem die Hauptmenge des in der Droge enthaltenen freien Podophyllotoxins enthalten war. Der Drogenrückstand wurde anschliessend viermal mit je 5 l Methanol extrahiert. Die vereinigten und auf etwa  $\frac{1}{3}$  im Vakuum konzentrierten Auszüge wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt. Diese wässrig-methanolische Lösung versetzte man zur Abtrennung der Gerbstoffe und von Farbstoffen mit einer konz. wässrigen Lösung von Bleiacetat, solange noch eine Fällung entstand. Das pH der Reaktionslösung wurde sorgfältig auf 6 eingestellt und der gelbe Niederschlag abfiltriert. Durch Einleiten von Schwefelwasserstoff fällte man überschüssiges Blei aus

<sup>1)</sup> Alle Smp. wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt. Zur Bestimmung der optischen Drehung wurden die Präparate ca. 1 Std. bei  $80^\circ$  im Hochvakuum getrocknet. Die Analysen wurden in unserm mikroanalytischen Laboratorium (Dr. W. Schöniger) ausgeführt. Die UV.-Spektren sind in unserm spektralanalytischen Laboratorium (Dr. H. G. Leemann) mit einem *Beckman*-Spektrophotometer, Modell DU, aufgenommen worden.

und verjagte den Holzgeist durch Konzentrieren im Vakuum. Die zurückbleibende wässrige Lösung, aus der sich während des Eindampfens noch wenig gelbliche Harze abschieden, wurde zuerst zweimal mit wenig Chloroform ausgeschüttelt, das neben harzigen Verunreinigungen auch noch geringe Mengen Podophyllotoxin aufnahm. Die klare, nur noch sehr wenig gefärbte wässrige Lösung wurde hierauf mehrmals mit Essigester oder mit Chloroform, das etwa 10% eines niedermolekularen Alkohols, wie z. B. Äthanol enthielt, ausgeschüttelt. Das neue Glucosid ging dabei in das organische Lösungsmittel über, das im Vakuum abdestilliert wurde. Der mit Äther gewaschene Eindampfrückstand stellte ein fast weisses, lockeres Pulver (etwa 20 g) dar.

Mannigfaltige Versuche, aus diesem Glucosidpräparat durch Behandeln mit den verschiedensten Lösungsmitteln irgendeine kristallisierte Komponente abzutrennen, schlugen fehl, obwohl man auf Grund verschiedener Bestimmungen annehmen musste, dass das neue Glucosid in diesem Präparat etwa 40-proz. vorliegen musste<sup>1)</sup>. Bei einem Versuch der Verteilung zwischen Wasser und Essigester liessen sich etwa 60% dieses Rohproduktes in die Essigesterschicht überführen, so dass angenommen werden konnte, dass eine Verteilung zwischen diesen beiden Lösungsmitteln, z. B. in einer grösseren, für präparative Zwecke geeigneten Säule zu einer weiteren Anreicherung des Glucosids führen würde. Wir verwendeten zur Bereitung der Säule fein gemahlene Diatomitstein, der für die Isolierung von Herzglykosiden so gute Dienste geleistet hatte<sup>2)</sup>.

**Tabelle 1.**  
Fraktionierung des rohen Glucosidpräparates.

Fraktion Nr.	Eindampfrückstand, mg	$[\alpha]_D^{20}$ in Methanol	Farbreaktion mit wässriger $\text{FeCl}_3$ -Lösung
1	2290	-64,6°	sehr schwach grünlich
2	3910	-65,8°	sehr schwach grünlich
3	1470	-72,4°	sehr schwach grünlich
4	550	-73,3°	rotbraun
5	510	-70,7°	rotbraun
6	400	-72,9°	rotbraun
7	220	-67,6°	rotbraun
8	90		rotbraun
9	40		rotbraun
10	20		rotbraun

Die Mischung von 4050 g Diatomitstein mit 1350 g Wasser wurde in eine 4 m hohe Säule vom Durchmesser 5,6 cm eingefüllt, worauf man sie mit einer Mischung von 10 g des Glucosidrohpräparates und 200 g Diatomitstein beschickte. Die Säule wurde dann mit wassergesättigtem Essigester entwickelt. Die abfliessenden Fraktionen von je 1 l ergaben beim Eindampfen im Vakuum die in der Tab. 1 zusammengestellten Fraktionen.

Der erste Eindampfrückstand war etwas schmutzig-gelblich gefärbt; die folgenden Fraktionen stellten praktisch farblose Pulver dar, die aber keine Neigung zur Kristallisation zeigten. Die Hauptmenge der Substanz, die bereits mit den drei ersten Fraktionen aus der Säule eluiert worden war, zeigte bei der Eisenchloridreaktion eine nur wenig charakteristische Färbung. Erst von der 4. Fraktion an trat eine neue Substanz aus der Säule, die durch eine recht intensive, rotbraune Eisenchloridreaktion gekennzeichnet

<sup>1)</sup> Die verarbeitete indische Droge enthielt demnach etwa 0,8% Podophyllotoxin-glucosid.

<sup>2)</sup> Vgl. die näheren Angaben über Diatomitstein und über die Bereitung von Säulen in der Arbeit von A. Stoll & W. Kreis, *Helv.* **34**, 1431 (1951).

war<sup>1)</sup>. Es wurden deshalb die Fraktionen 1–3 von mehreren analogen Diatomitsteinsäulen vereinigt und erneut in Portionen von je 10 g in Säulen aus trockenem Diatomitstein (je 4050 g) mit wassergesättigtem Essigester als Lösungsmittel chromatographiert. Das Ergebnis dieser Fraktionierung an trockenem Trägermaterial ist in Tab. 2 zusammengestellt.

**Tabelle 2.**

Aufteilung der Glucosidfraktion an trockenem Diatomitstein.

Fraktion Nr.	Lösungsmittel je 1 l	Substanz mg	$[\alpha]_D^{20}$ in Methanol
1	Essigester wassergesättigt	470	– 54,1°
2	Essigester wassergesättigt	70	– 3,5°
3	Essigester wassergesättigt	130	– 45,5°
4	Essigester wassergesättigt	1020	– 68,7°
5	Essigester wassergesättigt	1710	– 67,3°
6	Essigester wassergesättigt	1500	– 69,6°
7	Essigester wassergesättigt	1230	– 71,8°
8	Essigester wassergesättigt	890	– 70,1°
9	Essigester wassergesättigt	640	– 73,9°
10	Essigester wassergesättigt	490	– 68,8°
11	Essigester wassergesättigt	380	– 68,9°
12	Essigester wassergesättigt	270	– 68,2°
13	Essigester wassergesättigt	110	– 72,2°
14	Essigester wassergesättigt	70	– 71,3°
15	Essigester wassergesättigt	60	– 73,5°
16	Essigester wassergesättigt	30	
17	Essigester wassergesättigt	10	
18	Essigester wassergesättigt	5	
19	Essigester wassergesättigt	5	
20	Essigester wassergesättigt	5	
21	Methanol	690	– 67,9°

Da keine der Fraktionen kristallisierte, so wurden die Spitzenfraktionen Nr. 4 bis 7 vereinigt. Diese enthielten das Podophyllotoxin-glucosid bereits weitgehend angereichert. Die Aufarbeitung der folgenden Fraktionen 8 bis 12 lieferte eine weitere Menge des neuen Glucosids.

Zur weiteren Reinigung wurde die Lösung des Spitzenpräparates in der fünffachen Menge trockenem Aceton unter intensivem Rühren in die 50fache Menge abs. Äther eingetropft. Es schieden sich weisse Flocken ab, die abfiltriert und mit Äther nachgewaschen wurden. Dieses Präparat, das in Form eines amorphen, fast weissen und lockeren Pulvers anfällt, stellt das reine Podophyllotoxin- $\beta$ -D-glucosid dar. Aus 1 kg indischer Droge konnten davon etwa 6 bis 7 g gewonnen werden. Es schmilzt bei 152–154° zu einer sirupösen, zähflüssigen Masse zusammen. Das Glucosid ist hygroskopisch und hält hartnäckig 1 ½ bis ½ Mol Wasser zurück. Die Analysenergebnisse sind deshalb sehr ab-

<sup>1)</sup> Durch Acetylieren der Fraktionen 4–10 und Chromatographie der rohen Acetate an Aluminiumoxyd konnte eine kristallisierte Acetylverbindung erhalten werden, die bei 167–169° schmolz und eine optische Drehung von  $[\alpha]_D = -77^\circ$  (in Chloroform) aufwies. Eine vorläufige Mitteilung über diese Verbindung, die sich von einem weiteren neuen Glucosid ableitet, ist inzwischen in Am. Soc. **76**, im Druck, erschienen 5. 10. 1954.

hängig von der Art der Trocknung, wie aus den folgenden Zahlen hervorgeht. Nach dem Trocknen während vier Stunden bei 80° im Hochvakuum:

$C_{28}H_{32}O_{13} \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$  (603,56) Ber. C 55,72 H 5,85% Gef. C 55,79; 55,49 H 5,88; 5,72%

Nach 2 Std. Trocknen bei 95° im Hochvakuum:

$C_{28}H_{32}O_{13} \cdot 1H_2O$  Ber. C 56,56 H 5,76 (3)OCH<sub>3</sub> 15,66%  
(594,55) Gef. ,, 56,78 ,, 5,53 ,, 15,95%

Nach 15 Std. Trocknen bei 95° im Hochvakuum:

$C_{28}H_{32}O_{13} \cdot \frac{1}{2}H_2O$  Ber. C 57,43 H 5,68 O 36,89 (3)OCH<sub>3</sub> 15,90%  
(585,54) Gef. ,, 57,30 ,, 5,60 ,, 36,60 ,, 15,92%

Noch längeres Trocknen der Substanz bei 95° führt bereits zu merklicher Zersetzung. Aschebestimmungen mit diesem Präparat verliefen negativ.

Optische Drehung: In *Pyridin*: 13,368 mg Substanz mit Pyridin zu 2,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2 dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -1,56^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = -116,7^\circ \pm 2^\circ$$

In *Methanol*: 11,841 mg Substanz mit Methanol zu 2,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2 dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -0,89^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = -75,2^\circ \pm 2^\circ$$

In *Wasser*: 0,0529 g Substanz mit Wasser zu 10,0 cm<sup>3</sup> gelöst; 2 dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -0,69^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = -65,2^\circ \pm 2^\circ$$

Podophyllotoxin-glucosid ist leicht löslich in Alkoholen, Aceton und Essigester. Eine 2-proz. wässrige Lösung ist haltbar. Die Farbreaktion mit Eisenchlorid ist negativ.

Tetracetat des Podophyllotoxin-glucosids. Die Lösung von 300 mg Podophyllotoxin-glucosid<sup>1)</sup> in 3 cm<sup>3</sup> abs. Pyridin blieb nach Zugabe von 1,5 cm<sup>3</sup> Essigsäureanhydrid 12 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Die beim Eingiessen der Reaktionslösung in Eiswasser entstehende weisse Fällung wurde filtriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Man erhielt 370 mg des Acetylderivates<sup>1)</sup> (entspr. 95,5% der Theorie), das nach zweimaligem Umkristallisieren aus der 5fachen Menge Methanol in farblosen kleinen Prismen erhalten wurde und bei 134–135° schmolz. Die Substanz wurde für die Analyse 4 Std. im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

$C_{36}H_{40}O_{17}$  Ber. C 58,06 H 5,41 O 36,53 (3)OCH<sub>3</sub> 12,50 (4)CH<sub>3</sub>CO 23,12%  
(744,68) Gef. ,, 58,04 ,, 5,51 ,, 36,36 ,, 12,25 ,, 22,37%

Alkalische Titration: 7,876 mg Substanz wurden in 11,260 cm<sup>3</sup> 0,01-n. wässriger KOH-Lösung 2 Std. am Rückfluss gekocht, worauf man mit 0,01-n. Schwefelsäure gegen Phenolphthalein zurücktitierte. Verbrauch 5,417 cm<sup>3</sup> 0,01-n. KOH.

Äquivalentgewicht Ber. 148,9 Gef. 145,4

Der Laugenverbrauch entspricht somit 4 Acetylgruppen und einer Lactongruppierung.

Optische Drehung: 12,340 mg Substanz mit Chloroform zu 2,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2 dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -1,12^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = -90,8^\circ \pm 2^\circ$$

Die Acetylverbindung ist auch zum Nachweis des Glucosids in Rohprodukten geeignet. Die nach der Abtrennung der Gerbstoffe aus den Ausschüttelungen mit dem alkoholhaltigen Chloroform anfallenden Fraktionen wurden acetyliert und dann chromatographiert. 3,8 g eines solchen Glucosidpräparates lieferten 4,15 g Acetylprodukt, das in 400 cm<sup>3</sup> Benzol gelöst wurde. Diese Lösung wurde durch eine Säule aus 120 g alkalifrei

<sup>1)</sup> Die Gewichtsangaben sind auf wasserfreie Substanzen umgerechnet.

gewaschenem  $\text{Al}_2\text{O}_3$  filtriert, worauf man das Chromatogramm entsprechend den Angaben in Tabelle 3 entwickelte.

**Tabelle 3.**

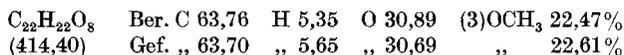
Chromatographie eines Rohproduktes von Tetracetyl-podophyllotoxin-glucosid an  $\text{Al}_2\text{O}_3$

Fraktion Nr.	Lösungsmittel	Rückstand mg	Kristalle mg	$[\alpha]_D^{20}$ in Chloroform
1	Benzol	2,8		
2	Benzol	108,2	100	– 88°
3	Benzol	376,8	340	– 87°
4	Benzol	215,2	195	– 87,5°
5	Benzol	140,7	125	– 89°
6	Benzol	138,9	125	– 85,5°
7	Benzol	119,1	105	– 88,5°
8	Benzol	109,4	100	– 86,5°
9	Benzol-Chloroform 1:1	690,4	610	– 86,5°
10	Benzol-Chloroform 1:1	232,3	205	– 86°
11	Benzol-Chloroform 1:1	181,8	150	– 85,5°
12	Chloroform	79,0	65	– 75,2°
13	Chloroform	33,7	20	– 36°
14	Chloroform	18,4	—	

Beim Anreiben der einzelnen Trockenrückstände 2 bis 13 mit Methanol scheiden sich je nach Reinheitsgrad aus einer anfangs harzigen schwerlöslichen Masse mehr oder weniger schnell Kristalle ab. Die Fraktionen 2 bis 11 wurden vereinigt und aus Methanol umkristallisiert. Das so erhaltene Tetracetyl-podophyllotoxin-glucosid besitzt die oben beschriebenen Eigenschaften

2. Enzymatische Hydrolyse des Podophyllotoxin-glucosids mit  $\beta$ -Glucosidase. 1 g Podophyllotoxin-glucosid wurde in 12,5 cm<sup>3</sup> abs. Alkohol gelöst, mit 250 cm<sup>3</sup> 1/50-m. Acetatpuffer vom pH 5,0 und 500 mg Emulsin (*Merck*) versetzt, und das Reaktionsgemisch bei 37° gerührt. Aus der anfangs nur schwach getrübbten Lösung begannen sich bereits nach etwa 30 Min. Nadeln abzuscheiden. Nach 24 Std. wurden die Kristalle abfiltriert und mit 50 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschen. Es wurden nach dem Trocknen im Hochvakuum 720 mg Aglykon gewogen, was beweist, dass die enzymatische Spaltung praktisch quantitativ verlaufen ist. Aus der Pufferlösung und dem Waschwasser konnten durch Ausschütteln mit Chloroform nur noch etwa 40 mg z. T. kristalline Substanz gewonnen werden. Die vom Aglykon befreite wässrige Phase enthielt den abgespaltenen Zucker, den man, wie weiter unten beschrieben wird, identifizierte.

Das Aglykon (720 mg) wurde zur Reinigung aus Benzol-Petroläther umkristallisiert und schied sich daraus in schlanken Nadelchen ab, die bei 114–117° unter Aufschäumen schmolzen. Für die Analyse wurde das Präparat 24 Std. im Hochvakuum bei 100° getrocknet<sup>1)</sup>.



<sup>1)</sup> Das hochvakuumtrockene Präparat ist hygroskopisch. Es schmilzt unscharf bei etwa 130–140° unter Aufschäumen. In der Literatur wird für die hochvakuumtrockene Substanz auch ein Smp. bei 183–184° angegeben [*J. L. Hartwell & A. W. Schrecker, Am. Soc. 73, 2913 (1951)*]; wir haben diesen hohen Smp. bei unseren Präparaten nicht beobachten können.

*Optische Drehung*: 12,298 mg Substanz (aus Benzol-Petroläther kristallisiert und 1 Std. im Hochvakuum bei 80° getrocknet) mit Chloroform zu 2,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2 dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -1,62^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = -131,7^\circ \pm 2^\circ$$

*UV.-Spektrum* (in abs. Alkohol):  $\lambda$  max. bei 291 m $\mu$  ( $\log \epsilon = 3,64$ );  $\lambda$  min. bei 260 m $\mu$  ( $\log \epsilon = 3,10$ ).

Das Aglykon stimmt in allen Eigenschaften mit dem in der Literatur<sup>1)</sup> beschriebenen Podophyllotoxin überein.

Podophyllotoxinacetat: Zur weiteren Charakterisierung des Aglykons wurden 350 mg, die durch enzymatische Spaltung erhalten wurden, mit 5 cm<sup>3</sup> Essigsäureanhydrid 30 Min. am Rückfluss gekocht. Beim Eingiessen der leicht gelblichen Lösung in 50 cm<sup>3</sup> Wasser schieden sich Öltropfen ab, die rasch durchkristallisierten. Das rohe Kristalliat (420 mg) lieferte nach dem Umkristallisieren aus abs. Alkohol farblose, dünne Prismen vom Smp. 210–211°. Für die Analyse wurde eine Probe 6 Std. im Hochvakuum bei 95° getrocknet.

C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	Ber. C 63,15	H 5,30	O 31,55	(3)OCH <sub>3</sub> 20,40%
(456,43)	Gef. „ 63,14	„ 5,30	„ 31,57	„ 20,55%

*Optische Drehung*: 13,180 mg Substanz (1 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet) mit Chloroform zu 2,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2 dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -1,76^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = -133,5^\circ \pm 2^\circ$$

*UV.-Spektrum* (in abs. Alkohol):  $\lambda$  max. bei 292 m $\mu$  ( $\log \epsilon = 3,67$ );  $\lambda$  min. bei 260 m $\mu$  ( $\log \epsilon = 3,10$ ).

Die Acetylverbindung ist in allen Eigenschaften identisch mit dem in der Literatur<sup>2)</sup> beschriebenen Podophyllotoxin-acetat.

Die wässrige Lösung, die den Zucker aus dem enzymatischen Abbau enthält, wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft. Den Rückstand löste man in 30 cm<sup>3</sup> Wasser, filtrierte von ungelösten Anteilen ab und versetzte das Filtrat mit 60 cm<sup>3</sup> abs. Alkohol. Dabei entstand ein flockiger Niederschlag, der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde erneut eingedampft, der Eindampfrückstand in 1 cm<sup>3</sup> Wasser aufgenommen, der entstandene Sirup mit 50 cm<sup>3</sup> Methanol verdünnt und nach Filtration von wenig Flocken wieder eingedampft. Man erhielt einen gelben Sirup, der nach Zusatz von 50 cm<sup>3</sup> n. abs. methanolischer HCl 16 Std. am Rückfluss gekocht wurde. Nach Neutralisieren mit frisch gefälltem Silbercarbonat und Abtrennen von den Silbersalzen wurde das Filtrat eingedampft und der erhaltene gelbe Sirup in wenig Methanol aufgenommen. Nach dem Wiedereindampfen der filtrierten Lösung schieden sich beim Anreiben mit einigen Tropfen Methanol lange farblose Stäbchen vom Smp. 159–169° ab. Sublimation der Kristalle im Hochvakuum bewirkte ein Ansteigen des Smp. auf 168–169°; eine Mischung des Sublimates mit authentischem  $\alpha$ -Methyl-D-glucosid <1,5><sup>3)</sup> ergab keine Depression.

*Optische Drehung*: 18,687 mg Substanz (1 Std. im Hochvakuum bei 80° getrocknet) mit Methanol zu 2,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2 dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = +3,07^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = +164,3^\circ \pm 3^\circ$$

<sup>1)</sup> Nach J. L. Hartwell & A. W. Schrecker, Am. Soc. **73**, 2913 (1951), liegt der Smp. für die lösungsmittelhaltige Substanz bei 114–116°, und der Drehwert für die getrocknete Substanz bei  $-132^\circ$  (in Chloroform).

<sup>2)</sup> W. Borsche & J. Niemann, A. **494**, 126 (1932), geben für den Drehwert  $-134,9^\circ$  (in Chloroform) an; J. L. Hartwell & A. W. Schrecker, Am. Soc. **73**, 2914 (1951), fanden den Smp. 209,5–210,5° und den Drehwert  $-143^\circ$  (in Chloroform).

<sup>3)</sup> B. Helferich & W. Schäfer, Organic Synth. Coll. Vol. I, 364.

3. Umlagerung von Podophyllotoxin-glucosid in Picropodophyllin-glucosid. Die Lösung von 500 mg Podophyllotoxin-glucosid<sup>1)</sup> in 25 cm<sup>3</sup> Methanol wurde mit 2,5 cm<sup>3</sup> konz. wässrigem Ammoniak versetzt und dann am Rückfluss erwärmt. Schon nach etwa 5 Min. begannen sich feine Nadelchen abzuschneiden, und nach weitem 5 Min. erstarrte die ganze Lösung zu einem Kristallbrei. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde das Gemisch noch 10 Min. im Sieden gehalten. Die nach dem Abkühlen abfiltrierten weissen verfilzten Kristalle wurden mit Methanol gewaschen und getrocknet (470 mg). Durch Konzentration der Mutterlauge liessen sich weitere 20 mg Kristalle isolieren; es hatten sich demnach 98% der Einwaage<sup>1)</sup> durch die Behandlung mit Ammoniak in die kristallisierte Picro-Verbindung umgelagert. Nach 2maligem Umkristallisieren aus der 300- bis 400-fachen Menge heissem 75-proz. Methanol zeigte das Picropodophyllin-glucosid einen Doppel-Smp. bei 235—236<sup>o</sup>/252—254<sup>o</sup>. Wie das isomere Podophyllotoxin-glucosid hält auch die Picro-Verbindung beim Trocknen hartnäckig Wasser zurück. Eine Probe, die im Hochvakuum 4 Std. bei 80<sup>o</sup> getrocknet war, ergab folgende Analysenwerte:

$C_{28}H_{32}O_{13} \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$	Ber. C 55,72	H 5,85	(3)OCH <sub>3</sub> 15,43%
(603,56)	Gef. ,, 55,71	,, 6,02	,, 15,57%

Nach 4stündigem Trocknen im Hochvakuum bei 100<sup>o</sup>:

$C_{28}H_{32}O_{13} \cdot \frac{1}{2}H_2O$	Ber. C 57,43	H 5,68	(3)OCH <sub>3</sub> 15,90%
(585,54)	Gef. ,, 57,39	,, 5,70	,, 15,51%

*Optische Drehung:* 13,310 mg Substanz mit Pyridin zu 2,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2 dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -0,14^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = -10,5^\circ \pm 2,5^\circ$$

Die Eigenschaften der Verbindung stimmen mit den in der Literatur<sup>2)</sup> für das Picropodophyllin- $\beta$ -D-glucosid angegebenen Daten überein. Die glatte und praktisch quantitative Überführbarkeit des amorphen Podophyllotoxin-glucosids in die schwerlösliche und kristallisierte isomere Picro-Verbindung spricht für den hohen Reinheitsgrad des amorphen Glucosidpräparates.

Durch Acetylieren mit Essigsäureanhydrid in Pyridin wird die Picro-Verbindung in das Tetracetyl-picropodophyllin-glucosid übergeführt. Das Rohprodukt wurde aus Chloroform-Methanol (1:2) umkristallisiert und schied sich dabei in weissen, verfilzten Nadelchen vom Smp. 278—279<sup>o</sup> ab<sup>2)</sup>. Für die Analyse wurde die Substanz 6 Std. im Hochvakuum bei 95<sup>o</sup> getrocknet.

$C_{36}H_{40}O_{17}$	Ber. C 58,06	H 5,41	O 36,53	CH <sub>3</sub> CO 23,12	OCH <sub>3</sub> 12,50%
(744,68)	Gef. ,, 58,34	,, 5,36	,, 36,19	,, 19,43	,, 12,42%

*Optische Drehung:* 15,840 mg Substanz (2 Std. im Hochvakuum bei 80<sup>o</sup> getrocknet) mit Chloroform zu 2,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2 dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -0,05^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = -3,2^\circ \pm 2^\circ$$

4. Alkalische Hydrolyse des Tetracetyl-podophyllotoxin-glucosids. Isolierung und Identifizierung des Picropodophyllin-glucosids. a) *Spaltung der Acetylverbindung mit Bariummethylat*. Die Lösung von 200 mg der reinen Acetylverbindung in 20 cm<sup>3</sup> Methanol wurde nach Zusatz von 0,1 cm<sup>3</sup> einer Bariummethylatlösung (entsprechend 0,66 cm<sup>3</sup> n. Schwefelsäure) bei 0<sup>o</sup> gehalten. Bereits nach kurzem Stehen begann sich aus der anfangs klaren Lösung eine kristalline Substanz abzuschneiden. Nach 15 Std. wurden die abgeschiedenen Kristalldrüsen abfiltriert (140 mg). Zur Umkristallisation benötigte man 30 cm<sup>3</sup> siedenden 70-proz. Methylalkohol, woraus sich die

<sup>1)</sup> Die Gewichtsangaben beziehen sich auf wasserfreie Substanz.

<sup>2)</sup> M. V. Nadkarni, J. L. Hartwell, P. B. Maury & J. Leiter, Am. Soc. 75, 1308 (1953), geben für das Picropodophyllin-glucosid folgende Werte an: Smp. 237—238,2<sup>o</sup> und  $[\alpha]_D^{20} = -11,5^\circ$  (in Pyridin). Für das Acetylderivat: Smp. 269—270,2<sup>o</sup> und  $[\alpha]_D^{20} = -5,2^\circ$  (in Chloroform).

Substanz in feinen Nadeln abschied, die bei 230–233<sup>o</sup>/249–251<sup>o</sup> schmolzen und sich mit dem Picropodophyllin-glucosid als identisch erwiesen.

*Optische Drehung:* 55,1 mg Substanz mit Pyridin zu 10,0 cm<sup>3</sup> gelöst; 2 dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -0,15^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$

$$[\alpha]_D^{20} = -13,6^{\circ} \pm 2^{\circ}$$

b) *Spaltung der Acetylverbindung mit Hydrogencarbonat in Methanol.* Zu einer Lösung von 0,50 g des Tetracetyl-podophyllotoxin-glucosids in 100 cm<sup>3</sup> Methanol wurde die Lösung von 0,50 g KHCO<sub>3</sub> in 12,5 cm<sup>3</sup> Wasser hinzugefügt. Die klare, schwach alkalische Lösung blieb bei Zimmertemperatur stehen. Nach 2 Tagen hatte sich bereits eine reichliche Menge von feinen Nadeln abgeschieden, die filtriert und mit Methanol ausgewaschen wurden (290 mg). Nach dem Umkristallisieren aus siedendem 80-proz. Methanol schieden sich sehr feine Nadeln (Smp. 230–233<sup>o</sup>/248–252<sup>o</sup>) ab, die sich eindeutig als Picropodophyllin-glucosid erwiesen. Trotz der sehr schonenden Verseifungsmethode ist die isomere Picro-Verbindung als einziges Reaktionsprodukt entstanden.

### Zusammenfassung.

Aus den Rhizomen der indischen Droge *Podophyllum emodi Wall.* konnte ein neues Glucosid, das Podophyllotoxin- $\beta$ -D-glucosid, C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub>, isoliert werden. Sein Aglucon ist der wichtigste Wirkstoff der Harzfraction dieser Droge. Das Glucosid konnte aus den wasserlöslichen Anteilen der Rhizome nach Abtrennen der chloroformlöslichen Harze in einer Menge von 0,5 bis 1% gewonnen werden. Die Eigenschaften des neuen Glucosids werden beschrieben. Besonders hervorzuheben sind die recht gute Löslichkeit in Wasser, die Umlagerung in das schwerlösliche Picropodophyllin-glucosid, die bereits unter sehr milder Alkali-Einwirkung stattfindet, und die leichte Spaltbarkeit mit  $\beta$ -Glucosidase, wobei Podophyllotoxin und D-Glucose erhalten werden konnten.

Pharmazeutisch-Chemisches Laboratorium *Sandoz*, Basel.

## 205. Synthese des N-Methyl-piperidin-4,4-dicarbon säure-diäthylesters

von J. Schmutz, F. Künzle und R. Hirt.

(24. VIII. 54.)

Für Synthesen benötigten wir den N-Methyl-piperidin-4,4-dicarbon säure-diäthylester. Unseres Wissens ist diese Verbindung noch nicht beschrieben worden, wohl aber erhielten *Anker, Cook & Heilbron*<sup>1)</sup> den N-Phenyl-piperidin-4,4-dicarbon säure-diäthylester durch Kondensation von N-Phenyl-di-( $\beta$ -chloräthyl)-amin und Malonester

<sup>1)</sup> R. M. Anker, A. H. Cook & I. M. Heilbron, Soc. 1945, 917.